

BEST AVAILABLE COPY

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/68421</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. November 2000 (16.11.00)</p>					
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03989</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 2000 (04.05.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table border="0"> <tr> <td>199 21 281.3</td> <td>7. Mai 1999 (07.05.99)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>199 36 875.9</td> <td>5. August 1999 (05.08.99)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): VER- MICON AG [DE/DE]; Dachauer Strasse 148, D-80992 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SNAIDR, Jiri [DE/DE]; Dachauer Strasse 148, D-80992 München (DE).</p> <p>(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentanwalts-GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, D-80335 München (DE).</p>	199 21 281.3	7. Mai 1999 (07.05.99)	DE	199 36 875.9	5. August 1999 (05.08.99)	DE	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
199 21 281.3	7. Mai 1999 (07.05.99)	DE					
199 36 875.9	5. August 1999 (05.08.99)	DE					
<p>(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS IN A SAMPLE</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEISEN VON MIKROORGANISMEN IN EINER PROBE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for detecting microorganisms in a sample by means of a nucleic acid probe. Conventional detection methods are, for example, the in-situ hybridization of microorganisms with fluorescence-labeled oligonucleotide probes (fluorescent in-situ hybridization). A disadvantage of said method is that an epifluorescence microscope is required for evaluating the results. According to the invention, the disadvantages of the in-situ hybridization method are overcome by hybridizing the microorganisms to be detected in a sample with a specific nucleic acid probe, removing non-hybridized nucleic acid probe molecules, separating and then detecting and optionally quantifying the hybridized nucleic acid probe molecules.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in einer Probe mittels einer Nukleinsäuresonde. Herkömmliche Verfahren sind z.B. die in situ-Hybridisierung von Mikroorganismen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (fluoreszierende in situ-Hybridisierung). Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit, die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop vorzunehmen. Erfindungsgemäß werden die Nachteile des in situ-Hybridisierungsverfahrens überwunden, indem die nachzuweisenden Mikroorganismen in einer Probe mit einer spezifischen Nukleinsäuresonde hybridisiert werden, nicht hybridisierte Nukleinsäuresondenmoleküle entfernt werden und die hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle abgelöst und anschließend detektiert und gegebenenfalls quantifiziert werden.</p>							

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbajdschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zum Nachweisen von Mikroorganismen in einer Probe

- Die Identifizierung von Mikroorganismen konnte viele Jahrzehnte nur nach
5 vorhergehender Kultivierung der Mikroorganismen und damit einhergehender
Amplifizierung erfolgen. Diese Kultivierung erfolgt z.B. für Viren auf ihrem
jeweiligen Wirtsorganismus, für Bakterien, Pilze und einzellige Algen in
Nährmedien. Für die Erfassung der Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen in einer
10 bestimmten Probe wurden Medien bzw. Bedingungen gewählt, welche eine selektive
Erfassung bestimmter Gruppen weitgehend ausschließen sollten. So wurden z.B. von
bakteriellen Einzelkolonien Reinkulturen angelegt und diese aufgrund phäno-
typischer Merkmale, z.B. ihrer Morphologie und Stoffwechselwege, identifiziert. Die
Identifizierung von Mikroorganismen nach vorheriger Kultivierung ist jedoch mit
zwei entscheidenden Nachteilen verbunden. Erstens belegen Untersuchungen an den
15 verschiedensten Umweltproben, daß nur 0,1 bis 14 % aller Bakterien z.Z.
kultivierbar sind. Zweitens konnte bewiesen werden, daß bei der Kultivierung starke
Populationsverschiebungen auftreten können, d.h. bestimmte Bakteriengruppen im
Labor bevorzugt bzw. andere diskriminiert werden.
- 20 Dies bedeutet nicht nur, daß ein Großteil der Bakterien in Umweltproben nicht
erkannt werden kann, sondern auch, daß diejenigen Bakterien, welche identifiziert
werden, meist ein verzerrtes Abbild der wahren Populationsstrukturen darstellen.
Fehleinschätzungen der Populationsverhältnisse in bezug auf Identifizierung und
Quantifizierung der Bakterien sind die Folge.
- 25
- Anfang der neunziger Jahre wurde ein Verfahren zur in situ-Hybridisierung mit
fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden entwickelt, das in vielen
Umweltproben erfolgreich zum Einsatz kam (Amann et al. (1990) J. Bacteriol.
172:762). Dieses "FISH" genannte (fluoreszierende in situ-Hybridisierung)
30 Verfahren beruht auf der Tatsache, daß die in jeder Zelle vorhandenen ribosomalen
RNAs (rRNAs) hochkonservierte, d.h. wenig spezifische, und weniger konservierte,
d.h. gattungs- und artspezifische Sequenzen umfaßt. Schon Mitte der achtziger Jahre

- 2 -

wurde gezeigt, daß die Sequenzen der 16S- und 23S-rRNA zur Identifizierung von Mikroorganismen genutzt werden können (Woese (1987) Microbiol. Reviews 51:221; De Long et al. (1989) Science 243:1360). Bei dem FISH-Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Gensonden, deren Sequenzen zu einer bestimmten Region auf
5 der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Sondenmoleküle sind in der Regel 16 bis 20 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und sind einem Zielbereich komplementär, der für eine bestimmte Bakterienart oder eine bakterielle Gattung spezifisch ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Gensonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so bindet
10 sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß durch die in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden bis zu 90% einer Bakteriengesamtpopulation
15 detektiert werden können. Das Verfahren stellt daher bereits eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik dar, der die Detektion von maximal 14% der Bakterienpopulation einer Umweltprobe möglich machte. Darüber hinaus erlaubt es das Verfahren der in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden, den aktiven Anteil einer Population zu bestimmen, indem das Verhältnis
20 einer gegen alle Bakterien gerichteten Sonde und dem Trockengewicht bestimmt wird. Schließlich erlaubt das Verfahren, Bakterien direkt am Ort ihres Wirkens sichtbar zu machen, wodurch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bakterienpopulation erkannt und analysiert werden können.

25 Innerhalb der letzten Jahre wurde die Technik der in situ-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden für die verschiedensten Umweltproben ausgetestet und erfolgreich angewandt. So konnten durch den Einsatz von Gensonden im Boden, in Protozoen, in Biofilmen, in der Luft, in Seen, in biologisch aktivierten Filtern und

- im Abwasser von Kläranlagen die jeweiligen Bakterienpopulationen untersucht und neuartige Bakterien identifiziert werden. Der Schwerpunkt lag hierbei in der Analyse der Bakterienpopulationen bei der Abwasserreinigung. Tropfkörper-, Raumfiltrations- und Belebtschlammanlagen wurden ebenso untersucht wie die
- 5 Nachklärbecken und entsprechenden Vorfluter (Snaidr et al. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:2884). Durch die in situ-Hybridisierungstechnik konnte gezeigt werden, daß es bei der Erfassung der Belebtschlammflora durch Kultivierung zu einem Kultivierungsshift kommt (Wagner et al. (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59:1520). Kultivierungsabhängige Verfahren liefern daher nur einen sehr
- 10 verfälschten Einblick in die Zusammensetzung und Dynamik der mikrobiellen Biozönose. Durch diese Medium-abhängige Verzerrung der realen Verhältnisse innerhalb der Bakterienpopulation werden Bakterien, die im Belebtschlamm eine untergeordnete Rolle spielen, aber den eingesetzten Kultivierungsbedingungen gut angepaßt sind, in ihrer Bedeutung dramatisch überschätzt. So konnte gezeigt werden,
- 15 daß aufgrund eines solchen Kultivierungsartefakts die Bakteriengattung *Acinetobacter* bezüglich ihrer Rolle als biologischer Phosphatentferner in der Abwasserreinigung völlig falsch eingeschätzt wurde.

- Obwohl die in situ-Hybridisierung mit den neu entwickelten fluoreszenzmarkierten
- 20 Gensonden eine rasche und genaue Analyse von Bakterienpopulationen im Abwasser möglich macht, konnte sie sich in der Praxis noch nicht durchsetzen. Gründe hierfür sind der hohe Anschaffungspreis für die benötigten technischen Geräte wie Fluoreszenzmikroskope, der Bedarf an qualifizierten Kräften, welche für die Durchführung und Auswertung zur Verfügung stehen müssen, sowie die daraus
- 25 resultierende geringe Anzahl möglicher Referenzmessungen. Weiterhin ist ein hoher Zeitaufwand für das Auszählen der detektierten Bakterienpopulationen (Quantifizierung) notwendig. Überdies erfordert das Auszählen hohe

- 4 -

Erfahrungswerte, da zwischen echten (Sondenbindung hat tatsächlich stattgefunden) und falschen Signalen (Autofluoreszenz, keine Zellen) unterschieden werden muß.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Verfügung zu
5 stellen, mit dem Mikroorganismen möglichst ohne vorherige Kultivierung nachgewiesen und gegebenenfalls quantifiziert werden können.

Eine weitere wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen bereitzustellen, das unter Bedingungen
10 durchgeführt wird, die gewährleisten, daß die Messergebnisse bei der Detektion und, falls erwünscht, bei der Quantifizierung nicht nachteilig beeinflusst werden.

Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen bereitzustellen, das umweltfreundlicher, schneller
15 durchführbar und leichter handhabbar ist als die im Stand der Technik beschriebenen Verfahren.

Erfindungsgemäß werden diese Aufgaben durch ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in einer Probe mittels einer Nukleinsäuresonde gelöst, wobei das
20 Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Fixieren der in der Probe enthaltenen Mikroorganismen;
- b) Inkubieren der fixierten Mikroorganismen mit nachweisbaren
25 Nukleinsäuresondenmolekülen, um eine Hybridisierung herbeizuführen;
- c) Entfernen nicht hybridisierter Nukleinsäuresondenmoleküle;

- 5 -

- d) Ablösen der hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle und
- e) Detektieren und gegebenenfalls Quantifizieren der abgelösten Nukleinsäuresondenmoleküle.

5

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter "Fixieren" von Mikroorganismen eine Behandlung verstanden werden, mit der die den jeweiligen Mikroorganismus umgebenden Hüllen so durchlässig gemacht werden sollen, daß die Nukleinsäuresonde mit der gegebenenfalls kovalent verbundenen Markierung durch die Hülle penetrieren kann, um so die Zielsequenzen im Zellinneren erreichen zu können. Bei der Hülle kann es sich z.B. um die ein Virus umgebende Lipidhülle, um die Zellwand eines Bakteriums oder die Zellmembran eines einzelligen Mikroorganismus handeln. Zur Fixierung wird üblicherweise eine geringprozentige Paraformaldehydlösung verwendet. Sollte mit einer Paraformaldehydlösung im Einzelfall die einen Mikroorganismus umgebende Schutzhülle nicht penetrierbar gemacht werden können, so sind dem Fachmann ausreichend weitere Maßnahmen bekannt, die zu demselben Ergebnis führen. Dazu zählen beispielsweise Ethanol, Methanol, Mischungen dieser Alkohole mit Paraformaldehyd, enzymatische Behandlungen, Ultraschallbehandlung etc.

20

Bei einer Nukleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide umfassen wird, bevorzugt zwischen 12 und 100 oder 15 und 50, besonders bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide. Die Nukleinsäuresonde ist so ausgewählt, daß es eine zu ihr komplementäre Sequenz im nachzuweisenden Mikroorganismus bzw. in der Gruppe nachzuweisender Mikroorganismen gibt. Komplementarität muß bei einer Sonde von nur ca. 15 Nukleotiden über 100 % der Sequenz gegeben sein, bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere

25

Fehlpaarungsstellen erlaubt. Es muß jedoch gewährleistet sein, daß das Nukleinsäuresondenmolekül mit moderaten und/oder stringenten

Hybridisierungsbedingungen tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z.B. 0 % Formamid in einem

- 5 Hybridisierungspuffer wie er in Beispiel 1 beschrieben ist. Stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20 - 80 % Formamid in dem in Punkt 5.2 von Beispiel 1 beschriebenen Puffer.

Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12

- 10 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 2 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44°C und 48°C, besonders bevorzugt 46°C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergentien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von der Sonden bzw. den Sonden, insbesondere deren Länge(n) und
- 15 dem Grad der Komplementarität mit der Targetsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Der Fachmann ist mit hier einschlägigen Berechnungen vertraut.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens hat eine typische

- 20 Hybridisierungslösung eine Salzkonzentration von 0,1 M bis 1,5 M, bevorzugt von 0,9 M, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfaßt der Hybridisierungspuffer üblicherweise ein Detergens, wie z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001-0,1%, bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%, und Tris/HCl in einem Konzentrationsbereich von
- 25 0,001-0,1 M, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,02 M. Der pH-Wert von Tris/HCl beträgt üblicherweise zwischen 6 und 10, wobei ein pH von ca. 8,0 bevorzugt ist. Wie oben erwähnt, kann die Hybridisierungslösung des weiteren

- 7 -

zwischen 0% und 80% Formamid enthalten, je nachdem welcher Grad von Stringenz erwünscht ist bzw. benötigt wird.

- Die Nukleinsäuresonde sollte im Hybridisierungspuffer wenn möglich in einer
- 5 Menge von 15 ng bis 1000 ng anwesend sein, wobei diese Menge vorzugsweise in 80 µl Hybridisierungslösung enthalten ist. Besonders bevorzugt beträgt die Sondenkonzentration 125 ng/80 µl Hybridisierungslösung.

- Nach erfolgter Hybridisierung sollten die nicht hybridisierten und überschüssigen
- 10 Sondenmoleküle entfernt werden, was üblicherweise mittels einer herkömmlichen Waschlösung bzw. Waschpuffers erfolgt. Dieser Waschpuffer enthält gewöhnlicherweise 0,001-0,1% eines Detergens wie SDS, wobei eine Konzentration von 0,01% bevorzugt wird, und Tris/HCl in einer Konzentration von 0,001-0,1 M, bevorzugt 0,02 M, wobei der pH-Wert von Tris/HCl im Bereich von 6,0 bis 10,0,
- 15 vorzugsweise bei 8,0, liegt. Weiter enthält der Waschpuffer üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz zwischen 0,003 M und 0,9 M, bevorzugt zwischen 0,01 M und 0,9 M, beträgt. Zusätzlich kann die Waschlösung EDTA enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0,005 M beträgt.
- 20 Das „Abwaschen“ der nicht gebundene Sondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 44°C bis 52°C, bevorzugt zwischen 46°C und 50°C und besonders bevorzugt bei 48°C für eine Dauer von 10-40 Minuten, vorzugsweise für 20 Minuten.

- 25 Nach erfolgter in situ-Hybridisierung und anschließender Entfernung der nicht-hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle mittels des oben beschriebenen Waschschrittes erfolgt die Abtrennung der hybridisierten Sondenmoleküle für die Detektion und, falls erwünscht, Quantifizierung der hybridisierten Sondenmoleküle.

- Für diesen Extraktionsschritt sind solche Extraktionsmittel geeignet, die bei einer geeigneten Temperatur eine Denaturierung der Sonde von der Targetsequenz gewährleisten, ohne die Sondenmoleküle in nennenswertem Ausmaß zu beschädigen. Letzteres ist insbesondere deswegen wünschenswert, um die Messergebnisse bei der
- 5 nachfolgenden Detektion und Quantifizierung nicht nachteilig zu beeinflussen. Bevorzugt wird hierfür als Ablöselösung bzw. Ablösepuffer Wasser, also $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest./bidest.}}$ oder schwach gepuffertes Wasser, also bspw. Tris/HCl, im Konzentrationsbereich von 0,001 M bis 1,0 M, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01 M, verwendet, wobei der pH von Tris/HCl zwischen 7,0 und
- 10 11,0, vorzugsweise 9,0, beträgt. Weiter sind im Rahmen dieser Erfindung auch DMSO (Dimethylsulfoxid) und 1 x SSC, pH 10,0 (+/- 2,0) als Extraktionsmittel geeignet, wobei 1 x SSC geeigneterweise durch Verdünnung einer 20 x SSC-Stamm-
lösung (175,2 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat, auffüllen mit Wasser auf 1 Liter) zubereitet wird.
- 15 Die Ablösung der Sondenmoleküle erfolgt üblicherweise für eine Dauer von 5 bis 30 Minuten, bevorzugt für 15 Minuten. Dabei erfolgt die Sondenextraktion in einem Temperaturbereich von 50-100°C, vorzugsweise bei unter 100°C, insbesondere bevorzugt bei etwa 80°C. In jedem Fall sollte versucht werden, die Extraktion bei
- 20 einer Temperatur durchzuführen, die eine effektive, aber gleichzeitig für die Sondenmoleküle schonende Abtrennung gewährleistet. Da die Sonden durch die Extraktionsbehandlung umso weniger beeinträchtigt werden, je geringer die Temperatur ist, wird eine Temperatur < 100°C, insbesondere < 90°C bevorzugt.
- 25 In einem Vergleichsversuch wurden $4,8 \times 10^6$ *Burkholderia cepacia*-Zellen mit zwei fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (jeweils 2,5 µl BET42a-Cy3 bzw. NonEUB338-Cy3) mittels des erfindungsgemäßen Fast-FISH-Verfahrens hybridisiert. Die Sondenextraktion erfolgte 15 Minuten bei 80°C mit 110 µl

- 9 -

- Ablöselösung, wobei $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 0,01 M Tris/HCl, pH 9,0, 1 x SSC, pH 10,0, DMSO und Formamid hinsichtlich des Meßsignals, also der Fluoreszenzintensität miteinander verglichen wurden. Während sowohl mit Wasser, 0,01 M Tris/HCl, 1 x SSC und DMSO gute bis sehr gute Ergebnisse erzielt werden konnten, konnte unter
- 5 Verwendung von Formamid kein, der Sondenextraktion mit den anderen Ablöselösungen vergleichbares Meßsignal erzielt werden. Vielmehr war das mit Formamid als Extraktionslösung erreichbare Signal um mindestens Faktor 10 geringer als die Intensitäten, die bspw. mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder 0,01 M Tris/HCl gemessen werden konnten. Bei einer Ablösetemperatur von 100°C (also einer Temperatur des Extraktionsmittels
- 10 von 100°C) war der Unterschied in den Meßsignalen zwischen Formamid einerseits und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bzw. 0,01 M Tris/HCl andererseits noch stärker ausgeprägt. Diese Beobachtungen sind höchstwahrscheinlich auf eine noch stärkere Beeinträchtigung der Sondenmoleküle durch Formamid mit zunehmender Temperatur zurückzuführen.
- 15 Aufgrund dieser Beobachtungen werden insbesondere $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder 0,01 M Tris/HCl als Extraktionsmittel gegenüber Formamid, das im Stand der Technik in der Regel als Extraktionsmittel empfohlen wird, bevorzugt. Durch den Verzicht von Formamid im Extraktionsschritt erzielt man nicht nur eine schonendere Behandlung, es ergeben sich zusätzlich auch Vorteile hinsichtlich des Gefahrenpotentials, da es
- 20 sich bei Formamid um eine Substanz der Giftklasse 3 handelt. Darüber hinaus ist die Verwendung von Formamid im Vergleich zu Wasser oder schwach gepuffertem Wasser wesentlich kostenintensiver.
- Die Auswahl der jeweiligen Nukleinsäuresonde erfolgt in Abhängigkeit vom nach-
- 25 zuweisenden Mikroorganismus: Sollen beispielsweise nur Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus salivarius* nachgewiesen werden, nicht jedoch Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus thermophilus*, so wird der Fachmann eine geeignete Sequenz auswählen, die in *Streptococcus salivarius* auftritt, in

- 10 -

Streptococcus thermophilus dagegen nicht. Typischerweise werden diese Sequenzen aus der 16S- oder 23S-rRNA ausgewählt. Ist dagegen erwünscht, alle Bakterien der Gattung *Streptococcus* zu erfassen, wird eine Sequenz ausgewählt werden, die *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus thermophilus* sowie weiteren Spezies der

5 Gattung *Streptococcus* gemeinsam ist. Für solche Sequenzen sind in der Literatur bereits viele Beispiele veröffentlicht, siehe z.B. Beimfohr et al. (1993) System Appl. Microbiol. 16:450. Die Nukleinsäuresonde kann dabei komplementär zu einer chromosomalen oder episomalen DNA sein, aber auch zu einer mRNA oder rRNA des nachzuweisenden Mikroorganismus. Dabei ist es bevorzugt, Nukleinsäuresonden

10 zu wählen, die einem Bereich komplementär sind, der in einer Kopienzahl von mehr als 1 im jeweiligen nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Die nachzuweisende Sequenz liegt bevorzugt 500 - 100.000 mal pro Zelle vor, besonders bevorzugt 1000 - 50.000 mal. Dies ist ein weiterer Grund, warum die Nukleinsäuresonde besonders bevorzugt komplementär zu einer rRNA ist: die

15 ribosomalen RNAs sind Bestandteile der Ribosomen, die, da sie die Proteinsynthesemoleküle darstellen, in jeder aktiven Zelle vieltausendfach vorhanden sind.

Erfindungsgemäß wird die Nukleinsäuresonde mit dem im obengenannten Sinne fixierten Mikroorganismus inkubiert, um so ein Eindringen der

20 Nukleinsäuresondenmoleküle in den Mikroorganismus und die Hybridisierung von Nukleinsäuresondenmolekülen mit den Nukleinsäuren des Mikroorganismus zu erlauben. Daran anschließend werden nicht hybridisierte Nukleinsäuresondenmoleküle durch übliche Waschschriffe entfernt. Im Gegensatz zum herkömmlichen FISH-Verfahren werden nunmehr jedoch nicht die

25 hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle in situ, also im jeweiligen Mikroorganismus, belassen, sondern von der nachzuweisenden Nukleinsäure wiederum abgelöst und von zellulären Bestandteilen getrennt, detektiert und gegebenenfalls quantifiziert. Voraussetzung dafür ist, daß das erfindungsgemäß

verwendete Nukleinsäuresondenmolekül nachweisbar ist. Diese Nachweisbarkeit kann z.B. durch kovalente Verbindung des Nukleinsäuresondenmoleküls mit einem detektierbaren Marker sichergestellt werden. Als detektierbare Marker werden üblicherweise fluoreszierende Gruppen, z.B. Cy-2, Cy-3 oder Cy-5, FITC, CT, 5 TRITC oder Fluos-Prime verwendet, die dem Fachmann alle wohlbekannt sind; der Vollständigkeit halber sind einige Marker, ihre Eigenschaften und Bezugsquellen in der folgenden Tabelle 1 angegeben.

10

TABELLE 1

15	FLUOS: 5,(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland); $\epsilon = 7,50 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 494 nm; Em_{max} bei 518 nm, MG = 473.
20	TRITC: Tetramethylrhodamin-5,6-isothiocyanat (Isomer G. Molecular Probes Inc., Eugene, USA, Lambda, Graz, AT); $\epsilon = 1,07 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 537 nm; Em_{max} bei 566 nm, MG = 479.
25	CT: 5,(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxysuccinimidester (Molecular Probes Inc., Eugene, USA); $\epsilon = 0,87 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 537 nm; Em_{max} bei 566 nm.

- CY-3: NHS-Ester von Cy5.18
(Biological Detection Systems, Pittsburgh, USA);
(Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA);
5 $\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$,
Abs_{max} bei 532 nm; Em_{max} bei 565 nm. MG = 765,95.
- CY-5: NHS-Ester von Cy5.18
(Biological Detection Systems, Pittsburgh, USA);
10 (Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA);
 $\epsilon = > 2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l}^{-1}$, Abs_{max} bei 650 nm;
Em_{max} bei 667 nm. MG = 791,99.

- Bei Verwendung von fluoreszierenden Markern wird das erfindungsgemäße
15 Verfahren in Anlehnung an das oben erwähnte „FISH“-Verfahren im folgenden auch
als „Fast-FISH“-Verfahren bezeichnet.

- Alternativ werden chemolumineszierende Gruppen oder radioaktive Markierungen,
z.B. ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , verwendet. Nachweisbarkeit kann aber auch gegeben sein
20 durch Kopplung des Nukleinsäuresondenmoleküls mit einem enzymatisch aktiven
Molekül, beispielsweise alkalischer Phosphatase, saurer Phosphatase, Peroxidase,
Meerrettichperoxidase, β -D-Galaktosidase oder Glukoseoxidase. Für jedes dieser
Enzyme ist eine Reihe von Chromogenen bekannt, die anstelle des natürlichen
Substrats umgesetzt werden können, und entweder zu farbigen oder zu
25 fluoreszierenden Produkten umgesetzt werden können. Beispiele für solche
Chromogene sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben.

- 13 -

TABELLE 2

Enzyme	Chromogen
5 1. Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase	4-Methylumbelliferylphosphat (*), Bis(4-Methyliumbelliferylphosphat), (*) 3-O- Methylfluoreszein, Flavon-3-Diphosphattriammoniumsalz (*),
10	p-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz
2. Peroxidase	Tyraminhydrochlorid (*), 3-(p-Hydroxyphenyl)- Propionsäure (*), p-Hydroxyphenethylalkohol (*), 2,2'-Azino-di-3- ethylbenzthiazolinsulfonsäure (ABTS), ortho-Phenylendiamindihydrochlorid, o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, p-Ucresol (*), 3,3'-Dimethyloxybenzidin, 3-Methyl-2-benzothiazolin- hydrazon,
15	Tetramethylbenzidin
20	
25	
3. Meerrettichperoxidase	H_2O_2 + Diammoniumbenzidin H_2O_2 + Tetramethylbenzidin

- 14 -

- | | | |
|----|-------------------|--|
| 4. | β-D-Galaktosidase | o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid,
4-Methylumbelliferyl-β-D-galaktosid |
| 5 | 5. Glukoseoxidase | ABTS,
Glukose und Thiazolylblau |

* Fluoreszenz

10

Schließlich ist es möglich, die Nukleinsäuresondenmoleküle so zu gestalten, daß an ihrem 5'- oder 3'-Ende eine weitere zur Hybridisierung geeignete Nukleinsäuresequenz vorhanden ist. Diese Nukleinsäuresequenz umfaßt wiederum ca. 15 bis 1000, bevorzugt 15 bis 50 Nukleotide. Dieser zweite Nukleinsäurebereich

15 kann wiederum von Oligonukleotidsonden erkannt werden, die durch eines der obenerwähnten Mittel nachweisbar sind.

- Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der nachweisbaren Nukleinsäuresondenmoleküle mit einem Hapten. Nach Ablösung der
- 20 Nukleinsäuresondenmoleküle von der Zielnukleinsäure können die nunmehr separat vorliegenden Nukleinsäuresondenmoleküle mit das Hapten erkennenden nachweisbaren Antikörpern in Kontakt gebracht werden. Ein bekanntes Beispiel für ein solches Hapten ist Digoxigenin oder seine Derivate. Dem Fachmann sind über die angegebenen Beispiele hinaus viele weitere Möglichkeiten bekannt, ein zur
- 25 Hybridisierung verwendetes Oligonukleotid zu detektieren und zu quantifizieren.

Die Vielzahl möglicher Markierungen ermöglicht auch den gleichzeitigen Nachweis von zwei oder mehr verschiedenen, sich überlappenden oder sich nicht

überlappenden Populationen. So kann z.B. durch Verwendung von 2 verschiedenen Fluoreszenzmarkern *Streptococcus salivarius* neben *Streptococcus thermophilus*, oder *Streptococcus salivarius* neben der Streptococcen-Gesamtpopulation nachgewiesen werden.

5

Der mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens nachzuweisende Mikroorganismus kann ein prokaryontischer oder eukaryontischer Mikroorganismus sein. In den meisten Fällen wird es erwünscht sein, einzellige Mikroorganismen nachzuweisen. Relevante Mikroorganismen sind dabei vor allem Hefen, Bakterien, Algen oder

10 Pilze.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem Mikroorganismus um einen Angehörigen der Gattung *Salmonella*.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vielfältig angewendet werden. So ist es z.B. geeignet, Umweltproben auf das Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen zu untersuchen. Diese Umweltproben können aus dem Wasser, aus dem Boden oder aus der Luft entnommen sein. Für den Nachweis von bestimmten Bakterien in

20 Umweltproben ist normalerweise keinerlei vorausgehende Kultivierung notwendig.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Kontrolle von Lebensmittelproben. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Lebensmittelproben aus Milch oder Milchprodukten (Joghurt, Quark, Käse,

25 Butter, Buttermilch), Trinkwasser, Getränken (Säfte, Limonade, Bier), Backwaren oder Fleischwaren entnommen. Für den Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln kann u. U. eine vorherige Kultivierung erwünscht oder sogar vorgeschrieben sein. So ist es notwendig, z. B. für den Nachweis von einer einzigen

- 16 -

Salmonelle in 25 ml Milch, diese eine zeitlang zu kultivieren, um anschließend auch mit statistischer Zuverlässigkeit eine oder mehrere Salmonellen im Probenvolumen zu haben.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiter zur Untersuchung medizinischer Proben eingesetzt werden. Dabei ist es sowohl für die Untersuchung von Gewebeprobe, z.B. Biopsiematerial aus der Lunge, Tumor- oder entzündlichem Gewebe, aus Sekreten wie Schweiß, Speichel, Sperma und Ausfluß aus der Nase, Harnröhre oder Vagina sowie für Stuhl- und Urinuntersuchungen geeignet.

10

Ein weiteres Anwendungsgebiet für das vorliegende Verfahren ist die Untersuchung von Abwässern, z.B. Belebtschlamm, Faulschlamm oder anaerobem Schlamm. Darüber hinaus ist es geeignet, Biofilme in industriellen Anlagen zu analysieren, sowie auch sich natürlicherweise bildende Biofilme oder bei der Abwasserreinigung

- 15 bildende Biofilme zu untersuchen. Schließlich ist es auch zur Untersuchung und Qualitätskontrolle pharmazeutischer und kosmetischer Produkte, z.B. von Salben, Cremes, Tinkturen, Säften etc. geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine Möglichkeit dar, die in situ-

- 20 Hybridisierung zur Zellidentifizierung und gegebenenfalls Quantifizierung in der Praxis zu etablieren. Die erforderliche Ausstattung würde sich z.B. bei Verwendung von Fluoreszenzmolekülsonden auf den Erwerb eines Fluorometers beschränken (max. ca. DM 18000,--). Im Gegensatz dazu bewegt sich ein Epifluoreszenzmikroskop, das zur Durchführung des herkömmlichen FISH-
25 Verfahrens geeignet ist, und mit welchem ausreichend gute in situ-Hybridisierungsergebnisse erzielt werden können, in der Preisklasse von ca. DM 100000,--. Hinzu kommt, daß bei Verwendung z. B. von Cy-5 markierten Sonden, die Epifluoreszenzmikroskope zusätzlich mit einer hochwertigen CCD-Kamera

- 17 -

ausgestattet sein müssen (Preis zwischen DM 30000,-- und DM 50000,--). Aus diesem Grund stellt das erfindungsgemäße Verfahren eine wesentlich billigere Meßmethode dar, als die zeitaufwendige Quantifizierung am Epifluoreszenzmikroskop. Überdies sind die laufenden Kosten des erfindungsgemäßen Verfahrens

5 mittels Fluorometer wesentlich geringer als die des herkömmlichen Verfahrens mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Dies liegt vor allem daran, daß die Quecksilberhochdrucklampen (DM 450,-- pro Stück) der Epifluoreszenzmikroskope aus Qualitäts- und Sicherheitsgründen spätestens alle 100 Betriebsstunden erneuert werden müssen. Das enorm zeitaufwendige Zählen spezifisch markierter Zellen unter

10 dem Mikroskop führt somit zu einem hohen Lampenverschleiß. Die Xenonbogenlampe eines Fluorometers (DM 3000,--) hat selbst bei intensiver Auslastung des Gerätes eine Haltbarkeit von 1 bis 3 Jahren. Einen zusätzlichen Kostenfaktor stellen auch die für die Messung benötigten Personalkosten dar. Während die quantitative Analyse einer Umweltprobe mittels des herkömmlichen

15 Verfahrens vor allem beim Einsatz mehrerer Sonden mehrere Tage in Anspruch nimmt, sollte das erfindungsgemäße Verfahren diese Aufgabe innerhalb weniger Stunden erledigen. Für die Hybridisierung und Extraktion wird ein Zeitaufwand von 3 Stunden benötigt, die Quantifizierung im Fluorometer wird nur wenige Minuten in Anspruch nehmen. Die Quantifizierung könnte auch von ungeschulten Kräften

20 vorgenommen werden, wohingegen bei dem herkömmlichen Verfahren die visuelle Quantifizierung die Fähigkeiten eines Spezialisten erfordert.

Damit wird erfindungsgemäß ein Verfahren bereitgestellt, das im Vergleich mit den herkömmlichen Verfahren umweltfreundlicher sowie schneller und leichter

25 durchzuführen ist.

Obwohl die Erfindung im wesentlichen mit Bezug auf fluoreszenzmarkierte Sondenmoleküle beschrieben worden ist, versteht es sich von selbst, daß die genannten Vorteile bei Verwendung anderer Marker ebenfalls gegeben sind.

- 5 Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweisen von Mikroorganismen in einer Probe bereitgestellt. Der Inhalt eines solchen Kits richtet sich im wesentlichen nach der Natur des nachzuweisenden Mikroorganismus. Er umfaßt als wichtigsten Bestandteil eine für den jeweils nachzuweisenden Mikroorganismus spezifische Nukleinsäuresonde sowie eine
- 10 weitere Nukleinsäuresonde, mit der eine Negativkontrolle durchgeführt werden kann. Darüber hinaus umfaßt er einen Hybridisierungspuffer und gegebenenfalls einen Lysepuffer. Die Wahl des Hybridisierungspuffers hängt in erster Linie von der Länge der verwendeten Nukleinsäuresonden ab. So müssen, wie dem Fachmann bekannt ist, für die Hybridisierung einer Nukleinsäuresonde von 15 Nukleotiden Länge weniger
- 15 stringente Bedingung gewählt werden als für die Hybridisierung einer Sonde von 75 Nukleotiden Länge. Beispiele für Hybridisierungsbedingungen sind z. B. in Stahl & Amann (1991) in Stackebrandt u. Goodfellow (Hrsg.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, angegeben.
- 20 Die Zusammensetzung des Lysepuffers ist ebenfalls vom jeweiligen Mikroorganismus abhängig. So sind zur Lyse von Virushüllen, Zellwänden Gram-positiver oder Gram-negativer Bakterien, Zellmembranen von Hefe oder Algen jeweils leicht unterschiedliche Bedingungen erforderlich, die ohne weiteres in der Literatur festgestellt werden können.
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Kit spezifische Sonden zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*. In einer besonders

- 19 -

bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Nukleinsäuresondenmolekül zum spezifischen Nachweis eines Mikroorganismus um die Nukleinsäuresequenz

Salm63: 5'-TCGACTGACTTCAGCTCC-3'

5

und bei der Negativkontrolle um die Sequenz

NonSalm: 5'-GCTAACTACTTCTGGAGC-3'

10 oder um Nukleinsäuresondenmoleküle, die sich von Salm63 und/oder NonSalm durch eine Deletion und/oder Addition unterscheiden, wobei die Fähigkeit dieser Sonden, mit *Salmonella*-spezifischer Nukleinsäure zu hybridisieren, erhalten bleibt, oder um Nukleinsäuresondenmoleküle, die mit den zuvor genannten Nukleinsäuren hybridisieren können.

15

Die folgenden Abbildungen und die Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung und sollen nicht in einschränkender Weise ausgelegt werden.

20 Abbildungen

Abbildung 1 veranschaulicht, wie das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von Zellen eines Typs A eingesetzt werden kann, während gleichzeitig die Anwesenheit von Zellen eines Typs B ausgeschlossen wird. Dazu werden

25 Nukleinsäuresonden, die für die Zelltypen A und B spezifisch sind, bereitgestellt und mit der zu untersuchenden Probe hybridisiert. Während des Hybridisierungsvorganges dringen die verschiedenartig markierten Sonden A und B in die Zellen vom Typ A und C ein. Nur die Zelle vom Typ A enthält

- 20 -

Zielnukleinsäure mit den Bindungsstellen für Sonden vom Typ A, nicht jedoch die Zelle C. Darüber hinaus besitzt keine der beiden Zellen Bindungsstellen für Sonden vom Typ B, der deshalb nicht gebunden wird. Nach dem anschließenden Waschschrift befinden sich nur noch gebundene Nukleinsäuresonden vom Typ A in
5 den Zellen.

Die Mischung von Zellen, die zum Teil Nukleinsäuresondenmoleküle vom Typ A gebunden haben, wird einem Ablöseschritt unterworfen. Anschließend können die nun abgelösten Nukleinsäuresondenmoleküle vom Typ A quantifiziert werden.

10

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis einer Hybridisierung von 10 in H-Milch inokulierten *S. typhimurium* LT2 Zellen nach 13stündiger Inkubation bei 37°C, 40 % im HP, HVL 400.

15 Ansatz mit Salmonellen:

Salm63-Cy3	erfaßt <i>Salmonella</i> spec., stellt spezifisches Signal dar
non15-Cy3	Nonsense-Sonde, repräsentiert unspezifische Bindung und Hintergrund
(Kontrolle 1)	

20

Ansatz ohne Salmonellen:

Salm63-Cy3 erfaßt *Salmonella* spec, repräsentiert den Hintergrund mit der Salmonellen-spezifischen Sonde, da in diesem Ansatz keine Salmonellen vorhanden waren (Kontrolle 2)

25

BEISPIEL 1

Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella* in Milch

5

1. Allgemeine Beschreibung:

Das nachfolgend beschriebene Verfahren, im Rahmen dieser Erfindung "SalmoQuick-Verfahren" genannt, dient zur qualitativen Analyse von Bakterien der Gattung *Salmonella* in Lebensmitteln auf der Grundlage des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Identifizierung von Salmonellen erfolgt in 24 Stunden; dadurch ergibt sich ein erheblicher Geschwindigkeitsvorteil gegenüber konventionellen Methoden, die für eine Identifizierung je nach taxonomischer Genauigkeit zwischen 5 und 14 Tagen benötigen.

15 2. Grundprinzip:

Salmonellen in Milch werden durch gegen rRNA-gerichtete fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden spezifisch erfaßt. Nach entsprechend stringenten Waschschritten werden die gebundenen Sonden wieder von ihren Zielstellen in den Bakterien abgelöst und in einem Fluorometer quantifiziert. Durch die Höhe des erhaltenen Signals im Fluorometer kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob 20 in der Milch Salmonellen anwesend sind oder nicht.

3. Kurzbeschreibung:

Die Milchprobe, die auf die Anwesenheit von Salmonellen untersucht werden soll, 25 wird mehrere Stunden inkubiert. Auf diese Weise wird sichergestellt, daß durch die Vermehrung der eventuell in der Milch vorhandenen Salmonellen erstens genügend Zielstellen für die Detektion mit Sonden vorhanden sind und zweitens nur lebende Salmonellen identifiziert werden. Ein Populationsshift durch die mehrstündige

- Inkubation ist unschädlich, da es nur um die Gegenwart oder Abwesenheit von Salmonellen' nicht jedoch um den Nachweis aller Bakterien geht. Nach der Zentrifugation und der Fixierung der Zellen, während der die Zellen für die Sonden zugänglich gemacht werden, können durch einen Lyseschritt die die anschließende
- 5 Hybridisierung störenden Proteine ausreichend gut entfernt werden. Während der anschließenden Hybridisierung binden unter ausreichend stringenten Bedingungen die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden spezifisch an die rRNA oder Bakterien der Gattung *Salmonella*. Der anschließende Waschschrift sorgt für eine Entfernung der nicht gebundenen Sonden. Während einer weiteren
- 10 Behandlungsprozedur werden die spezifisch gebundenen Sonden aus den Zellen extrahiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe dieser Sonden können dann in einem Fluorometer quantifiziert werden. Die Höhe des erhaltenen Signals gibt Auskunft darüber, ob Salmonellen in der Milchprobe vorhanden waren oder nicht.

15 4. Technische Ausstattung:

4.1 Vorbereitung der Probe

Zur Probenvorbereitung werden benötigt:

- Probengefäß (Greiner, Nürtingen)
- 20 • Rundschüttler
- Greiner-Zentrifuge (8000 Umdrehungen / Minute)
- Tischzentrifuge (14000 Umdrehungen / Minute)

4.2 In situ-Hybridisierung

- 25 Für die in situ-Hybridisierung werden benötigt:
- Tischzentrifuge (14000 Umdrehungen / Minute)
 - Heizblock und Wasserbad oder zwei Heizblöcke
 - Hybridisierungsöfen

4.3 Quantifizierungsgerät

- Fluorometer, Chemiluminometer oder Szintillator

5 5. Materialien

5.1 Vorbereitung der Probe

Folgende Materialien wurden zur Verarbeitung der Probe einschließlich der Zellfixierung verwendet:

- | | | | |
|----|--|---|--------------|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> • 9 ml Saline-Röhrchen | 0,9 % NaCl in H ₂ O _{dest.} | |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Tryptic Soy Medium (TS-Medium) | | |
| | Casein Pepton | 15,0 g | |
| | Soja Pepton | 5,0 g | |
| 15 | NaCl | 5,0 g | |
| | H ₂ O _{dest.} | ad 1 l | pH 7,3 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Lyse-Puffer: | | |
| | Na ₂ HPO ₄ | 100 mM | |
| 20 | NaCl | 150 mM | |
| | EDTA | 10 mM | |
| | NaOH | 40 mM | |
| | <ul style="list-style-type: none"> • PBS-Stammlösung (Na_xPO₄) | | |
| 25 | 200 mM NaH ₂ PO ₄ | | |
| | 200 mM Na ₂ HPO ₄ | | pH 7,2 - 7,4 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • 3 x PBS-Lösung | | |

- 24 -

390 mM NaCl

30 mM Na_xPO₄ (PBS-Stammlösung) pH 7,2 - 7,4

- 1 x PBS-Lösung

5 130 mM NaCl

10 mM Na_xPO₄ (PBS-Stammlösung) pH 7,2 - 7,4

- 4% Paraformaldehydlösung (PFA):

Herstellbar durch Zugabe von 3 g Paraformaldehyd zu 30 ml auf 60°C erhitztem

- 10 H₂O_{bdest.}; tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH bis zum vollständigen Lösen des Paraformaldehyds; anschließend Hinzufügen von 16,6 ml 3 x PBS, Abkühlung der Lösung auf ca. 20°C; Einstellen des pH-Wertes mit 1 M HCl auf 7,2 - 7,4; Sterilfiltration der fertigen PFA-Lösung über einen 0,2µm-Filter (MILLIPORE, Eschborn). Die Lösung kann bei 4°C für ca. eine Woche aufbewahrt werden;
- 15 Einfrieren über mehrere Monate ist ebenfalls möglich.

5.2 In situ-Hybridisierung

- Formamid (Merk, Darmstadt)
- Sonden-Arbeitslösungen zu je 50 ng/µl (spezifische und unspezifische Sonde)

20

Ablösepuffer (2 ml):

0,01 M Tris/HCl pH 9,0

Hybridisierungspuffer (HP, 2 ml mit x% Formamidgehalt):

25	5 M NaCl		360 µl
	1 M Tris/HCl	pH 8,0	40 µl
	Formamid		y µl
	10% (w/v) SDS		2 µl

- 25 -

ad H₂O_{bidest.} 2 ml

Waschpuffer (2 ml):

	5 M NaCl		18,4 µl
5	1 M Tris/HCl	pH 8,0	40 µl
	0,5 M EDTA	pH 8,0	20 µl
	10% (w/v) SDS		2 µl
	ad H ₂ O _{bidest.}		2 ml

10 Sonden:

Salm63: 5'-TCGACTGACTTCAGCTCC-3'

NonSalm: 5'-GCTAACTACTTCTGGAGC-3'

verwendeter Fluoreszenzfarbstoff: Cy3

15

6. Durchführung

6.1 Vorbereitung der Milch

1. Milchproben und TS-Medium ca. 20 min auf 37°C vorwärmen.

20

2. Zugabe von 25 ml vorgewärmtem TS-Medium zu 25 ml vorgewärmter Milch in einem 50 ml fassenden Probengefäß.

3. Inkubation bei 30° über Nacht (13 Stunden) auf dem Rundschüttler.

25

4. Zentrifugation der 50 ml Probengefäße zur Zellernte bei 8000 Umdrehungen/min für 8 min.

- 26 -

5. Resuspension des Pellets mit 25 ml Lysepuffer zur Trennung von Proteinen und Fetten der Milch von den Zellen und anschließende Inkubation für 10 min bei RT (Raumtemperatur).
- 5 6. Zentrifugation für 8 min bei 8000 Umdrehungen/min.
7. Wiederholung der Resuspension und Inkubation mit Lysepuffer (siehe 5.)
8. Zentrifugation für 8 min bei 8000 Umdrehungen/min.
- 10 9. Resuspension der pelletierten Zellen in 600 µl 1 x PBS und Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Spülen des 50 ml Probengefäßes mit 600 µl 1 x PBS.
10. Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min für
15 6 min.
11. Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Zellen in 1 ml 1 x PBS.
12. Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min für
20 6 min.
13. Verwerfen des Überstandes und vollständige Resuspension des Pellets in 200 µl
1 x PBS.
- 25 14. Zugabe von 600 µl einer frisch hergestellten 4%igen Paraformaldehydlösung.
15. Inkubation für 1 Stunde bei 4°C.

- 27 -

16. Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/min für 6 min.

17. Verwerfen des Überstandes und vollständige Resuspension des Pellets in 1 ml 1
x PBS.

5

18. Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/min für 6 min.

19. Verwerfen des Überstandes (Pellet verbleibt im Cap).

10

6.2 In situ-Hybridisierung

1. Vorwärmen des Hybridisierungspuffers auf 48°C im Wasserbad oder im
Heizblock für ca. 20 min.

15

2. Überführung der Eppendorf-Reaktionsgefäße (mit dem zurückgebliebenen
Zellpellet) auf den Heizblock (auf 80°C vorgeheizt) und Inkubation für 5 min bei
80°C.

20 3. Nach der 5 minütigen Inkubation bei 80°C Zugabe von 80 µl des vorgewärmten
Hybridisierungspuffers in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß.

4. Zugabe von je 2,5 µl der frisch aufgetauten Sonden-Arbeitslösung "Salm63-Cy3"
zu zwei der vier Milchproben-Ansätze.

25

5. Zugabe von je 2,5 µl der frisch aufgetauten Sonden-Arbeitslösung "nonSalm63-
Cy3" zu den beiden verbleibenden Milchproben-Ansätzen.

- 28 -

6. Heftig Durchmischen der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 10 Sekunden und
kurzes (2 Sekunden) Abzentrifugieren mittels einer kleinen Tischzentrifuge.
7. Inkubation der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 2 Stunden bei 46°C im
5 Hybridisierungssofen oder im Wasserbad bzw. Heizblock (Hybridisierung der
Sonde mit der Zielsequenz unter stringenten Bedingungen).
8. Vorwärmen des Waschpuffers auf 48°C im Wasserbad oder im Heizblock.
- 10 9. Nach Inkubation für 2 Stunden bei 46°C Zentrifugation der Eppendorf-
Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min für 6 min.
10. Vollständiges Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette
ohne das Pellet zu berühren.
15
11. Zugabe von 100 µl vorgewärmtem Waschpuffer, heftiges Durchmischen der
Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 Sekunden und Überführung ins Wasserbad bei
48°C für 20 Minuten (Entfernen der nicht gebundenen Sondenmoleküle unter
stringenten Bedingungen).
20
12. Vorwärmen des Ablösepuffers auf 80°C im Heizblock.
13. Nach 20 minütiger Inkubation bei 48°C Zentrifugation der Eppendorf-
Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min. für 6 min.
25
14. Vollständiges Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette
ohne das Pellet zu berühren.

- 29 -

15. Zugabe von 110 µl vorgewärmtem Ablösepuffer, heftiges Durchmischen der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 Sekunden und Überführung auf den Heizblock auf 80°C für 15 min (Ablösung der Sonde von der Zielsequenz).
- 5 16. Nach 15 minütiger Inkubation bei 80°C Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min für 6 min.
17. Vorsichtige Überführung des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße und anschließend Lagerung auf Eis
10 im Dunkeln bis zur Vermessung.
18. Fluorometer anschalten und die Wellenlängen auf 550 nm zur Anregung („Excitation wavelength“) und auf 570 nm („Emission wavelength“) zur Messung der Emission des Cy3-Farbstoffes einstellen.
15
19. High Voltage Level auf die gewünschte Empfindlichkeit einstellen (400 bis 800 HVL).
20. 107 µl Ablösepuffer in eine Präzisionsglasküvette für die Fluorometrie füllen.
21. Fluorometer auf Null stellen ("Autozero").
22. Eppendorf-Reaktionsgefäße kurz vor der Vermessung 5 Sekunden in der Hand auf Raumtemperatur vorwärmen.
25
23. Einfüllen des die abgelöste Sonde enthaltenden Ablösepuffers in die Präzisionsglasküvette für die Fluorometrie und Vermessung des Signals.

- 30 -

24. Ablesen des Signals nach 10 Sekunden, da nach dem Öffnen der Abdeckung des Lichtkanals das Signal nach 5 bis 8 Sekunden stabil ist.

25. Fluoreszenzwert der untersuchten Milchprobe = Fluoreszenzwert der mit
5 "Salm63-Cy3" hybridisierten Milchprobe abzüglich dem Fluoreszenzwert der mit
"nonSalm-Cy3" hybridisierten Milchprobe.

7. Ergebnis

Das Ergebnis des oben beschriebenen Versuches ist in Abb. 2 gezeigt. Es ist
10 eindeutig zu sehen, daß das Salmonellen-spezifische Signal um ein Vielfaches höher
ist als eine ebenfalls geprüfte unspezifische Bindung. Auch der Sondenbackground
war kaum nachweisbar.

- 31 -

BEISPIEL 2

Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella* in 25 ml Milch bzw. 25 g Milchpulver

5

Ansatz von zwei Milchproben von je 25 ml bzw. 25 g zur Hybridisierung mit den Sonden

"Salm63-Cy3" (Cy3-5'-TCGACTGACTTCAGCTCC-3') und "nonSalm-Cy3" (Cy3-5'-GCTAACTACTTCTGGAGC-3').

10

A. Zellfixierung:

Laboraausstattung:

- 100 ml- und 1 l-Erlenmeyerkolben
- 15 • Rundschüttler
- Probengefäß (Greiner, Nürtingen)
- Greiner Zentrifuge (8000 Umdrehungen / Minute)
- Tischzentrifuge (14000 Umdrehungen / Minute)

20 Materialien:

- 9 ml Saline-Röhrchen 0,9 % NaCl in H₂O_{dest}
- gepuffertes Peptonwasser (nach §35 LMBG) mit Malachitgrünzusatz

	Fleisch Pepton	10,0 g	
	NaCl	5,0 g	
25	Dinatriumhydrogenphosphat (*12 H ₂ O)	9,0 g	
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g	
	Malachitgrün (Oxalat)	0,1g	
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l	pH 7,2 +/- 0,2

- 32 -

225 ml-Portionen in 1 l-Erlenmeyerkolben und 30 ml-Portionen in 100 ml-Erlenmeyerkolben abfüllen und 15 min bei 121°C autoklavieren.

5 • Lyse-Puffer:

Na_2HPO_4	100 mM
NaCl	150 mM
EDTA	10 mM
NaOH	40 mM

10

Zur PFA-Zellfixierung verwendete Lösungen:

• PBS-Stammlösung (Na_xPO_4)200 mM NaH_2PO_4 200 mM Na_2HPO_4 pH 7,2 - 7,4

15

• 3 x PBS-Lösung

390 mM NaCl

30 mM Na_xPO_4 (PBS-Stammlösung) pH 7,2 - 7,4

20

• 1 x PBS-Lösung

130 mM NaCl

10 mM Na_xPO_4 (PBS-Stammlösung) pH 7,2 - 7,4

• 4% Paraformaldehydlösung (PFA):

- 25 Herstellbar durch Zugabe von 3 g Paraformaldehyd zu 30 ml auf 60°C erhitztem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$; tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH bis zum vollständigen Lösen des Paraformaldehyds; anschließend Hinzufügen von 16,6 ml 3 x PBS, Abkühlung der Lösung auf ca. 20°C; Einstellen des pH-Wertes mit 1 M HCl auf 7,2 - 7,4;

- 33 -

Sterilfiltration der fertigen PFA-Lösung über einen 0,2µm-Filter (MILLIPORE, Eschborn). Die Lösung kann bei 4°C für ca. eine Woche aufbewahrt werden; Einfrieren über mehrere Monate ist ebenfalls möglich.

5 Durchführung:

1. 225 ml gepuffertes Peptonwasser mit Malachitgrünzusatz auf 37 °C ca. 1 Stunde vorwärmen.
2. Zugabe von 25 ml Milch bzw. 25 g Milchpulver zu 225ml vorgewärmtem gepufferten Peptonwasser mit Malachitgrünzusatz und gründlich mischen.
10
3. Inkubation für 7,5 Stunden bei 37°C auf dem Rundschüttler.
4. Sterile Entnahme von 1 ml aus inkubiertem Ansatz und Überführung in 30 ml gepuffertes Peptonwasser mit Malachitgrünzusatz.
15
5. Inkubation über Nacht (mind. 14 Stunden) bei 37°C auf dem Rundschüttler.
6. Überführung der inkubierten 30 ml-Ansätze in 50 ml-Probengefäße zur Zellernte.
20
7. Zentrifugation der Probengefäße bei 8000 Umdrehungen/min für 8 min.
8. Resuspension des Pellets mit 20 ml Lysepuffer zur Trennung von Proteinen und Fetten der Milch von den Zellen und anschließende Inkubation für 10 min bei RT.
25
9. Zentrifugation für 8 min bei 8000 Umdrehungen/min.

- 34 -

10. Resuspension der pelletierten Zellen in 600 µl 1 x PBS und Überführung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß. Spülen des 50 ml Probengefäßes mit 600 µl 1 x PBS.
- 5 11. Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min für 6min.
12. Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Zellen in 1 ml 1 x PBS.
13. Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/min für 6min.
- 10 14. Verwerfen des Überstandes und vollständige Resuspension des Pellets in 450 µl 1 x PBS.
- 15 15. Zugabe von 1350 µl einer frisch aufgetauten Paraformaldehydlösung.
16. Inkubation für 1 Stunde bei 4°C.
17. Überführung von je 800 µl in zwei 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße für die anschließende Hybridisierung mit "Salm63-Cy3" und "nonSalm-Cy3".
- 20 18. Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.
19. Abnehmen und Verwerfen des Überstandes und vollständige Resuspension des Pellets in 1 ml 1 x PBS.
- 25 20. Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.
21. Abnehmen und Verwerfen des Überstandes (Pellet verbleibt im Cap).

B. Hybridisierung

Laborausstattung:

- 5
- Tischzentrifuge (14000 Umdrehungen / Minute)
 - Fluorometer (Kontron Instruments SFM 25)
 - Heizblock und Wasserbad oder zwei Heizblöcke (48°C und 80 °C)
 - Hybridisierungssofen (46°C)
- 10 Materialien
- Formamid (Merck, Darmstadt)
 - Sonden-Arbeitslösungen zu je 50 ng/µl: 25 µl "Salm63-Cy3", 25 µl "nonSalm-Cy3"

- 15 Ablösepuffer (2 ml):
- | | |
|-----------------|--------|
| 0,01 M Tris/HCl | pH 9,0 |
|-----------------|--------|

Hybridisierungspuffer (2 ml mit 40% Formamidgehalt):

- | | |
|------------------------------------|---------|
| 5 M NaCl | 360 µl |
| 20 1 M Tris/HCl pH8,0 | 40 µl |
| Formamid | 800 µl |
| 10 % (w/v) SDS | 2 µl |
| H ₂ O _{bidest} | ad 2 ml |

- 25 Waschpuffer (2ml):
- | | |
|---------------------|---------|
| 5 M NaCl | 18,4 µl |
| 1 M Tris/HCl pH 8,0 | 40 µl |
| 0,5 M EDTA pH 8,0 | 20 µl |

- 36 -

10% (w/v) SDS	2 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 2 ml

Durchführung:

- 5 1. Vorwärmen des Hybridisierungspuffers auf 48 °C im Wasserbad oder im Heizblock für ca. 20 min.
2. Überführung der Eppendorf-Reaktionsgefäße (mit dem zurückgebliebenen Zellpellet) auf den Heizblock (auf 80°C vorgeheizt) und Inkubation für 5 min bei
10 80 °C.
3. Nach der Inkubation bei 80 °C für 5 min Zugabe von 160 µl des vorgewärmten Hybridisierungspuffers in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß.
- 15 4. Zugabe von je 3,0 µl der frisch aufgetauten Sonden-Arbeitslösung "Salm63-Cy3" zu den zwei Parallelansätzen.
5. Zugabe von je 3,0 µl der frisch aufgetauten Sonden-Arbeitslösung "nonSalm-Cy3" zu den beiden verbleibenden Parallelansätzen.
20
6. Wirbeln (Vortexen) der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 10 Sekunden und kurzes (2 Sekunden) Abzentrifugieren mittels einer kleinen Tischzentrifuge.
7. Inkubation der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 2 Stunden bei 46 °C im
25 Hybridisierungssofen oder im Wasserbad bzw. Heizblock (Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz unter stringenten Bedingungen).
8. Vorwärmen des Waschpuffers auf 48 °C im Wasserbad oder im Heizblock.

- 37 -

9. Nach der Inkubation für 2 Stunden bei 46 °C Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.
- 5 10. Vollständiges Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren.
11. Zugabe von 180 µl vorgewärmtem Waschpuffer, Wirten der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 Sekunden und Überführung ins Wasserbad bei 48 °C für 20
- 10 Minuten (Entfernen der nicht gebundenen Sondenmoleküle unter stringenten Bedingungen.
12. Vorwärmen von ca. 1,4 ml Ablösepuffer auf 80 °C im Heizblock.
- 15 13. Nach Inkubation bei 48 °C für 20 min Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.
14. Vollständiges Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren.
- 20 15. Zugabe von 130 µl vorgewärmtem Ablösepuffer, Wirten der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 Sekunden und Überführung auf den Heizblock auf 80 °C für 15 Minuten (Ablösung der Sonde von der Zielsequenz).
- 25 16. Nach Inkubation bei 80°C für 15 min Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.

- 38 -

17. Vorsichtige Überführung des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße und anschließend Lagerung auf Eis im Dunkeln bis zur Vermessung.
- 5 18. Fluorometer anschalten und die Wellenlängen auf 550 nm zur Anregung ("Excitation wavelength") und auf 570 nm ("Emission wavelength") zur Messung der Emission des Cy3-Farbstoffes einstellen.
- 10 19. High Voltage Level auf die gewünschte Empfindlichkeit einstellen (400 bis 800 HVL).
20. 108 µl Ablösepuffer in eine Präzisionsglaskuvette für die Fluorometrie füllen.
21. Fluorometer auf Null stellen ("Autozero").
- 15 22. Eppendorf-Reaktionsgefäße kurz vor der Vermessung 5 Sekunden in der Hand auf Raumtemperatur vorwärmen.
- 20 23. Einfüllen des die abgelöste Sonde enthaltenden Ablösepuffers in die Präzisionsglaskuvette für die Fluorometrie und Vermessung des Signals.
24. Ablesen des Signals nach 10 Sekunden, da nach dem Öffnen der Abdeckung des Lichtkanals das Signal nach 5 bis 8 Sekunden stabil ist.
- 25 25. Fluoreszenzwert der untersuchten Milchprobe = Fluoreszenzwert der mit "Salm63-Cy3" hybridisierten Milchprobe abzüglich dem Fluoreszenzwert der mit "nonSalm-Cy3" hybridisierten Milchprobe.

BEISPIEL 3

Anwendung der Fast-FISH-Technik zur relativen Quantifizierung von
Bakterienpopulationen in Belebtschlamm (am Beispiel PPx3)

5

A. Zellfixierung:

Laboraausstattung:

- 2 ml-Reaktionsgefäße
- 10 • Tischzentrifuge (14000 Umdrehungen / Minute)

Zur PFA-Zellfixierung verwendete Lösungen:

- PBS-Stammlösung (Na_xPO_4)
 - 200 mM NaH_2PO_4
 - 15 200 mM Na_2HPO_4 pH 7,2 - 7,4
- 3 x PBS-Lösung
 - 390 mM NaCl
 - 30 mM Na_xPO_4 (PBS-Stammlösung) pH 7,2 - 7,4
 - 20
- 1 x PBS-Lösung
 - 130 mM NaCl
 - 10 mM Na_xPO_4 (PBS-Stammlösung) pH 7,2 - 7,4
 - 25
- 4% Paraformaldehydlösung (PFA):

Herstellbar durch Zugabe von 3 g Paraformaldehyd zu 30 ml auf 60°C erhitztem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$; tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH bis zum vollständigen Lösen des Paraformaldehyds; anschließend Hinzufügen von 16,6 ml 3 x PBS, Abkühlung der

- 40 -

Lösung auf ca. 20°C; Einstellen des pH-Wertes mit 1 M HCl auf 7,2 - 7,4;
Sterilfiltration der fertigen PFA-Lösung über einen 0,2µm-Filter (MILLIPORE,
Eschborn). Die Lösung kann bei 4°C für ca. eine Woche aufbewahrt werden;
Einfrieren über mehrere Monate ist ebenfalls möglich.

5

Durchführung:

1. Zugabe von drei Teilen 4 %iger Paraformaldehydlösung zu einem Teil frisch
gezogener Belebtschlammprobe (z.B. 30 ml 4 %ige Paraformaldehydlösung zu 10
ml Belebtschlamm).

10

2. Inkubation für 3 Stunden bei 4°C.

3. Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen/ min für 6min.

15 4. Verwerfen des Überstandes und vollständige Resuspension des Pellets in 1 ml 1 x
PBS.

5. Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen/ min für 6min.

20 6. Verwerfen des Überstandes (Pellet verbleibt im Cap).

7. Resuspension des Pellets mit 250 µl 1 x PBS.

8. Zugabe von 250 µl -18 °C-kaltem Ethanol.

25

9. Gründlich wirlen und gegebenenfalls bei -18 °C lagern (fixierte
Belebtschlammprobe).

- 41 -

B. Hybridisierung

Laborausstattung:

- Tischzentrifuge (14000 Umdrehungen / Minute)
- 5 • Fluorometer
- 1 Heizblock und 1 Wasserbad, oder 2 Heizblöcke
- Hybridisierungssofen

Materialien:

- 10 • Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Formamid (Merck, Darmstadt)
- Sonden-Arbeitslösungen zu je 50 ng / µl:

25 µl "PPx3 655-Cy3": 5'- ACC CTC CTC TCC CGG TCT -3'

alternativ zu PPx3 655-Cy3 kann PPx3 1428-Cy3 verwendet werden

15 " PPx3 1428-Cy3 5'- TGG CCC ACC GGC TTC GGG -3'

25 µl "Non15-Cy3": 5'- GCT AAC TAC TTC TGG AGC - 3'

25 µl „Non15-Cy5": 5'- GCT AAC TAC TTC TGG AGC - 3'

25 µl "3xEUB-Cy3": I 5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3'

II 5'- GCA GCC ACC CGT AGG TGT - 3'

20 III 5'- GCT GCC ACC CGT AGG TGT - 3'

25 µl „3xEUB-Cy5" I 5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3'

II 5'- GCA GCC ACC CGT AGG TGT - 3'

III 5'- GCT GCC ACC CGT AGG TGT - 3'

25 Ablösepuffer (2 ml):

0,01 M Tris/HCl pH 9,0

- 42 -

Hybridisierungspuffer: (2 ml mit 20% Formamidgehalt):

	5 M NaCl	360 µl
	1 M Tris/HCl pH8,0	40 µl
	Formamid	400 µl
5	10 % (w/v) SDS	2 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 2 ml

Waschpuffer (2ml):

	5 M NaCl	86 µl
10	1 M Tris/HCl pH 8,0	40 µl
	0,5 M EDTA pH 8,0	20 µl
	10% (w/v) SDS	2 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 2 ml

15 Ansatz (genaues Vorgehen: siehe "Durchführung"):

1. 2x definiertes Volumen fixierte Belebtschlammprobe (10 bis 100 µl) + 3xEub-Cy3
2. 2x definiertes Volumen fixierte Belebtschlammprobe + 3xEub-Cy5
3. 2x definiertes Volumen fixierte Belebtschlammprobe + Non15-Cy3
- 20 4. 2x definiertes Volumen fixierte Belebtschlammprobe + Non15-Cy5
5. 2x definiertes Volumen fixierte Belebtschlammprobe + 3xEub-Cy5 + PPx3 655-Cy3

Durchführung:

- 25 1. Vorwärmen des Hybridisierungspuffers auf 48 °C im Wasserbad oder im Heizblock für ca. 20 min.

- 43 -

2. Überführung eines definiertes Volumens PFA-fixierter Belebtschlammprobe (10 bis 100 µl) in Eppendorf-Reaktionsgefäße
3. Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/min für 6 min.
- 5 4. Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren.
- 10 5. Überführung der Eppendorf-Reaktionsgefäße (mit dem zurückgebliebenen Zellpellet) auf den Heizblock (auf 80 °C vorgeheizt) und Inkubation für 5 min bei 80 °C.
- 15 6. Nach der Inkubation bei 80 °C für 5 min Zugabe von 80 µl des vorgewärmten Hybridisierungspuffers in jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß.
7. Zugabe von je 2,5 µl der entsprechenden frisch aufgetauten Sonden-Arbeitslösung zu den Belebtschlamm-Ansätzen (siehe unter "Ansatz").
- 20 8. Wirbeln der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 10 Sekunden und kurzes (2 Sekunden) Abzentrifugieren mittels einer kleinen Tischzentrifuge.
9. Inkubation der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 2 Stunden bei 46 °C im Hybridisierungssofen oder im Wasserbad bzw. Heizblock (Hybridisierung der
- 25 Sonde mit der Zielsequenz unter stringenten Bedingungen).
10. Vorwärmen des Waschpuffers auf 48 °C im Wasserbad oder im Heizblock.

- 44 -

11. Nach der Inkubation für 2 Stunden bei 46 °C Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.
12. Vollständiges Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-
5 Pipette ohne das Pellet zu berühren.
13. Zugabe von 100 µl vorgewärmtem Waschpuffer, Wirten der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 Sekunden und Überführung ins Wasserbad bei 48 °C für 20
10 Minuten (Entfernen der nicht gebundenen Sondenmoleküle unter stringenten Bedingungen).
14. Vorwärmen des Ablösepuffers auf 80 °C im Heizblock.
15. Nach Inkubation bei 48 °C für 20 min Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.
15
16. Vollständiges Abnehmen und Verwerfen des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren.
- 20 17. Zugabe von 110 µl vorgewärmtem Ablösepuffer, Wirten der Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 Sekunden und Überführung auf den Heizblock auf 80 °C für 15 Minuten (Ablösung der Sonde von der Zielsequenz).
- 25 18. Nach Inkubation bei 80°C für 15 min Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14000 Umdrehungen/ min für 6min.

- 45 -

19. Vorsichtige Überführung des Überstandes mit einer 200 µl-Pipette ohne das Pellet zu berühren in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße und anschließend Lagerung auf Eis im Dunkeln bis zur Vermessung.
- 5 20. Fluorometer anschalten.
21. Für die Vermessung der Cy3-markierten Sonden Wellenlänge zur Anregung auf 550 nm ("Excitation wavelength") und zur Messung der Emission auf 570 nm ("Emission wavelength") einstellen.
- 10 22. Für die Vermessung der Cy5-markierten Sonden Wellenlänge zur Anregung auf 644 nm ("Excitation wavelength") und zur Messung der Emission auf 659 nm ("Emission wavelength") einstellen.
- 15 23. Bei Ansätzen mit beiden Farbstoffen (PPx3-Cy3 und 3xEub-Cy5) wird stets zuerst der Cy5-Wert und danach der Cy3-Wert bestimmt (wegen Ausbleicheffekten).
- 20 24. High Voltage Level auf die gewünschte Empfindlichkeit einstellen (400 bis 800 HVL).
- 25 25. 108 µl Ablösepuffer in eine Präzisionsglaskuvette für die Fluorometrie füllen.
26. Fluorometer auf Null stellen ("Autozero").
- 25 27. Eppendorf-Reaktionsgefäße kurz vor der Vermessung 5 Sekunden in der Hand auf Raumtemperatur vorwärmen.

- 46 -

28. Einfüllen des die abgelöste Sonde enthaltenden Ablösepuffers in die Präzisionsglaskuvette für die Fluorometrie und Vermessung des Signals.

29. Ablesen des Signals nach 10 Sekunden, da nach dem Öffnen der Abdeckung des Lichtkanals das Signal nach 5 bis 8 Sekunden stabil ist.

Berechnung des relativen Anteils der PPx3-Zellen im untersuchten Belebtschlamm:

10 Durchschnittlicher Meßwert der Belebtschlammprobe (BP) mit 3xEub-Cy =
Korrekturfaktor
Durchschnittlicher Meßwert der BP mit 3xEub-Cy5

15 Relativer Anteil der PPx3 Zellen in Prozent =

(Meßwert BP mit PPX3-Cy3 - durchschnittl. Meßwert BP mit Non15-Cy3) x 100
(Meßwert BP mit 3xEub-Cy5 - durchschnittl. Meßwert BP mit Non15-Cy5) x
Korrekturfaktor

20

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zum Nachweisen von Mikroorganismen in einer Probe mittels einer Nukleinsäuresonde, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Fixieren der in der Probe enthaltenen Mikroorganismen;
- 10 b) Inkubieren der fixierten Mikroorganismen mit nachweisbaren Nukleinsäuresondenmolekülen;
- c) Entfernen nicht hybridisierter Nukleinsäuresondenmoleküle,
- 15 d) Ablösen der hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle ohne Einsatz von Formamid, und
- e) Detektieren der abgelösten Nukleinsäuresondenmoleküle.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die abgelösten Nukleinsäuresondenmoleküle in Schritt e) zusätzlich quantifiziert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin die in Schritt d) verwendete Ablöselösung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasser, gepuffertem Wasser, DMSO und SSC.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 3, worin es sich bei der Ablöselösung um 0,001-1,0 M Tris/HCl, pH 9,0 +/- 2,0 handelt.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, worin es sich bei der Ablöselösung um 0,01 M Tris/HCl, pH 9,0 +/- 2,0 handelt.
- 5 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin Schritt d) bei einer Temperatur von 50-100°C erfolgt.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin Schritt d) bei einer Temperatur von unter 100°C erfolgt.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin Schritt d) bei einer Temperatur von ungefähr 80°C durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die
15 Nukleinsäuresonde komplementär zu einer chromosomalen oder episomalen DNA, einer mRNA oder rRNA eines nachzuweisenden Mikroorganismus ist.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Nukleinsäuresonde kovalent mit einem detektierbaren Marker verbunden ist.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, worin der detektierbare Marker ausgewählt ist aus der Gruppe der folgenden Marker:
- a) Fluoreszenzmarker,
 - b) Chemolumineszenzmarker,
 - 25 c) radioaktiver Marker,
 - d) enzymatisch aktive Gruppe,
 - e) Hapten,
 - f) durch Hybridisierung nachweisbare Nukleinsäure.

12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Mikroorganismus ein einzelliger Mikroorganismus ist.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Mikroorganismus eine Hefe, ein Bakterium, eine Alge oder ein Pilz ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Mikroorganismus der Gattung *Salmonella* angehört.
- 10 15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Probe eine Umweltprobe und aus Wasser, Boden oder Luft entnommen ist.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Probe eine Lebensmittelprobe ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Probe aus Milch oder Milchprodukten, Trinkwasser, Getränken, Backwaren oder Fleischwaren entnommen ist.
- 20 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Probe eine medizinische Probe ist.
- 25 19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Probe aus Gewebe, Sekreten oder Stuhl gewonnen ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Probe aus Abwasser gewonnen ist.

- 50 -

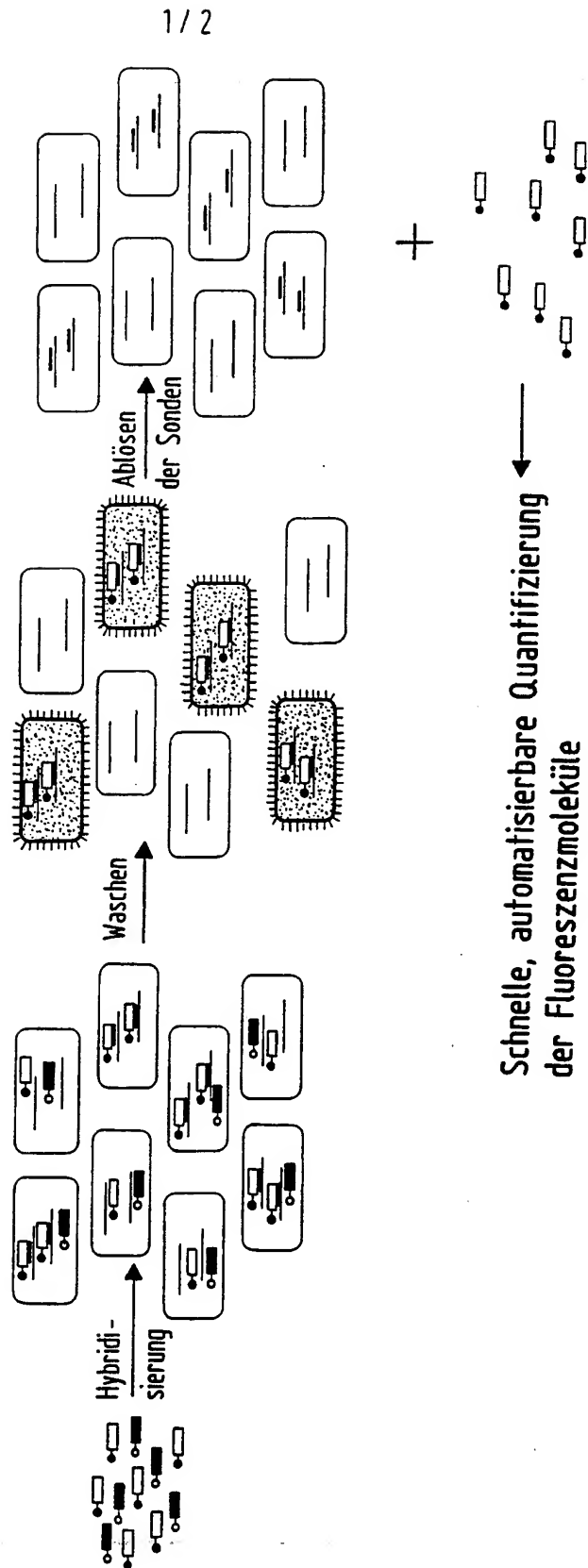
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Probe aus Belebtschlamm, Faulschlamm oder anaerobem Schlamm gewonnen ist.
- 5 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Probe aus einem Biofilm gewonnen wird.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei der Biofilm aus einer industriellen Anlage gewonnen wird, bei der Abwasserreinigung gebildet wurde oder ein
10 natürlicher Biofilm ist.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Probe einem pharmazeutischen oder kosmetischen Produkt entnommen ist.
- 15 25. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche, enthaltend
- a) mindestens einen Hybridisierungspuffer,
b) mindestens eine Nukleinsäuresonde,
b1) zum spezifischen Nachweis eines Mikroorganismus,
20 b2) zum Durchführen einer Negativkontrolle.
26. Kit nach Anspruch 25, enthaltend mindestens eine spezifische Sonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Salmonella*.
- 25 27. Kit nach Anspruch 26, enthaltend die Nukleinsäuresonden
Salm63: 5'-TCGACTGACTTCAGCTCC-3'
und
NonSalm: 5'-GCTAACTACTTCTGGAGC-3'

- 51 -

oder eine Nukleinsäuresonde, die sich von Salm63 und/oder NonSalm durch eine Deletion und/oder Addition unterscheidet, wobei die Fähigkeit dieser Sonde, mit Salmonella-spezifischer Nukleinsäure zu hybridisieren, erhalten bleibt, oder eine Nukleinsäure, die mit den zuvor genannten Nukleinsäuren hybridisieren kann.

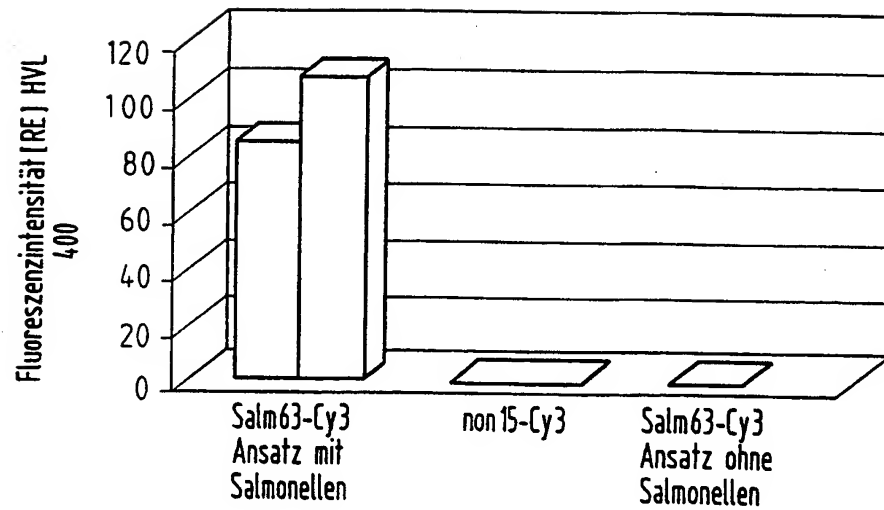
5

Abb. 1



2 / 2

Abb. 2



SEQUENZPROTOKOLL/V7231

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: VERMICON AG
- (B) STRASSE: Dachauer Str. 148
- (C) ORT: München
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 80992

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweisen von Mikroorganismen in einer Probe

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 36 875.9

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TCGACTGACT TCAGCTCC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCTAACTACT TCTGGAGC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ACCCTCCTCT CCCGGTCT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGGCCCACCG GCTTCGGG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCTAACTACT TCTGGAGC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GCTGCCTCCC GTAGGAGT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GCAGCCACCC GTAGGTGT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GCTGCCACCC GTAGGTGT

18

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. November 2000 (16.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/68421 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03989

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Mai 2000 (04.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 21 281.3 7. Mai 1999 (07.05.1999) DE
199 36 875.9 5. August 1999 (05.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): VERMICON AG [DE/DE]; Dachauer Strasse 148,
D-80992 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SNAIDR, Jiri
[DE/DE]; Dachauer Strasse 148, D-80992 München
(DE).

(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentan-
walts-GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, D-80335
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 9. August 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS IN A SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEISEN VON MIKROORGANISMEN IN EINER PROBE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting microorganisms in a sample by means of a nucleic acid probe. Conventional detection methods are, for example, the in-situ hybridization of microorganisms with fluorescence-labeled oligonucleotide probes (fluorescent in-situ hybridization). A disadvantage of said method is that an epifluorescence microscope is required for evaluating the results. According to the invention, the disadvantages of the in-situ hybridization method are overcome by hybridizing the microorganisms to be detected in a sample with a specific nucleic acid probe, removing non-hybridized nucleic acid probe molecules, separating and then detecting and optionally quantifying the hybridized nucleic acid probe molecules.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in einer Probe mittels einer Nukleinsäuresonde. Herkömmliche Verfahren sind z.B. die in situ-Hybridisierung von Mikroorganismen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (fluoreszierende in situ-Hybridisierung). Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit, die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop vorzunehmen. Erfindungsgemäß werden die Nachteile des in situ-Hybridisierungsverfahrens überwunden, indem die nachzuweisenden Mikroorganismen in einer Probe mit einer spezifischen Nukleinsäuresonde hybridisiert werden, nicht hybridisierte Nukleinsäuresondenmoleküle entfernt werden und die hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle abgelöst und anschließend detektiert und gegebenenfalls quantifiziert werden.

WO 00/68421 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/EP 00/03989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 18234 A (WAGNER MICHAEL ;SUEZ LYONNAISE DES EAUX (FR); MANEM JACQUES (FR);) 15 April 1999 (1999-04-15)	25
Y	the whole document	1-24
Y	SAMBROOK, FRITSCH, AND MANIATIS: "Molecular cloning-A laboratory manual" 1987, COLD SPRING HARBOUR PRESS, US XP002162309 "Hybridization of radiolabeled probes to immobilized nucleic acids" pgs 9.47-9.55 page 9.51 page 9.55	1-24



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 March 2001

Date of mailing of the international search report

19/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 00/03989

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NORDENTOFT STEEN ET AL: "Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of Salmonella serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 35, no. 10, 1997, pages 2642-2648, XP002162308 ISSN: 0095-1137 the whole document	25-27.
X	MOBARRY B K ET AL: "PHYLOGENETIC PROBES FOR ANALYZING ABUNDANCE AND SPATIAL ORGANIZATION OF NITRIFYING BACTERIA" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,US,WASHINGTON,DC, vol. 62, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 2156-2162, XP002068770 ISSN: 0099-2240 the whole document	25
X	AMANN R I ET AL: "PHYLOGENETIC IDENTIFICATION AND IN SITU DETECTION OF INDIVIDUAL MICROBIAL CELLS WITHOUT CULTIVATION" MICROBIOLOGICAL REVIEWS,US,AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, vol. 59, no. 1, 1 March 1995 (1995-03-01), pages 143-169, XP002026194 ISSN: 0146-0749 the whole document	25
A	US 5 750 340 A (THOMPSON DONALD M ET AL) 12 May 1998 (1998-05-12) the whole document	1-24
A	DE 42 16 949 A (CREMER CHRISTOPH PROF DR DR) 2 December 1993 (1993-12-02) the whole document	1-24
A	WO 98 15656 A (UNIV NEW MEXICO) 16 April 1998 (1998-04-16) the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PC1/EP 00/03989

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918234 A	15-04-1999	FR 2769323 A AU 1029499 A EP 1042502 A	09-04-1999 27-04-1999 11-10-2000
US 5750340 A	12-05-1998	AU 5712096 A CA 2217509 A EP 0820525 A JP 11503026 T WO 9631626 A US 6022689 A	23-10-1996 10-10-1996 28-01-1998 23-03-1999 10-10-1996 08-02-2000
DE 4216949 A	02-12-1993	WO 9324652 A EP 0745139 A US 5888734 A	09-12-1993 04-12-1996 30-03-1999
WO 9815656 A	16-04-1998	US 6022689 A AU 4808497 A EP 0935672 A	08-02-2000 05-05-1998 18-08-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03989

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 18234 A (WAGNER MICHAEL ;SUEZ LYONNAISE DES EAUX (FR); MANEM JACQUES (FR);) 15. April 1999 (1999-04-15)	25
Y	das ganze Dokument	1-24
Y	SAMBROOK, FRITSCH, AND MANIATIS: "Molecular cloning-A laboratory manual" 1987, COLD SPRING HARBOUR PRESS, US XP002162309 "Hybridization of radiolabeled probes to immobilized nucleic acids" pgs 9.47-9.55 Seite 9.51 Seite 9.55	1-24

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 00/03989

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NORDENTOFT STEEN ET AL: "Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of Salmonella serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 35, Nr. 10, 1997, Seiten 2642-2648, XP002162308 ISSN: 0095-1137 das ganze Dokument	25-27
X	MOBARRY B K ET AL: "PHYLOGENETIC PROBES FOR ANALYZING ABUNDANCE AND SPATIAL ORGANIZATION OF NITRIFYING BACTERIA" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,US,WASHINGTON,DC, Bd. 62, Nr. 6, 1. Juni 1996 (1996-06-01), Seiten 2156-2162, XP002068770 ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	25
X	AMANN R I ET AL: "PHYLOGENETIC IDENTIFICATION AND IN SITU DETECTION OF INDIVIDUAL MICROBIAL CELLS WITHOUT CULTIVATION" MICROBIOLOGICAL REVIEWS,US,AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, Bd. 59, Nr. 1, 1. März 1995 (1995-03-01), Seiten 143-169, XP002026194 ISSN: 0146-0749 das ganze Dokument	25
A	US 5 750 340 A (THOMPSON DONALD M ET AL) 12. Mai 1998 (1998-05-12) das ganze Dokument	1-24
A	DE 42 16 949 A (CREMER CHRISTOPH PROF DR) 2. Dezember 1993 (1993-12-02) das ganze Dokument	1-24
A	WO 98 15656 A (UNIV NEW MEXICO) 16. April 1998 (1998-04-16) das ganze Dokument	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03989

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9918234 A	15-04-1999	FR 2769323 A	09-04-1999
		AU 1029499 A	27-04-1999
		EP 1042502 A	11-10-2000
US 5750340 A	12-05-1998	AU 5712096 A	23-10-1996
		CA 2217509 A	10-10-1996
		EP 0820525 A	28-01-1998
		JP 11503026 T	23-03-1999
		WO 9631626 A	10-10-1996
		US 6022689 A	08-02-2000
DE 4216949 A	02-12-1993	WO 9324652 A	09-12-1993
		EP 0745139 A	04-12-1996
		US 5888734 A	30-03-1999
WO 9815656 A	16-04-1998	US 6022689 A	08-02-2000
		AU 4808497 A	05-05-1998
		EP 0935672 A	18-08-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.